

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590203

研究課題名（和文） GnRH ニューロンの脳内移動と軸索投射の制御機構

研究課題名（英文） The molecular mechanisms of migration of GnRH neurons and GnRH axon projection to the median eminence.

研究代表者

村上 志津子（MURAKAMI SHIZUKO）

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：20255649

研究成果の概要（和文）：ニワトリ胚組織を用いたコラーゲンゲル共培養の移動アッセイにより、GnRH ニューロンの脳内移動においてセマフォリン 3A-ニューロピリン 1 シグナルが反発性に作用する可能性が示された。また、胎生期スリット 1,2 ダブルノックアウトマウスでは GnRH ニューロンの脳内分布異常と正中隆起への投射異常が見られた。脳内移動環境における異常な神経線維走行が物理的バリアとなり引き起こされた二次的障害と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Migration assays in coculture explants of GnRH neurons in the embryonic chick dorsal septum region demonstrated that semaphorin 3A-neuropilin 1 signaling act as a chemorepulsive cue for the migration of GnRH neurons in the forebrain. In Slit1; Slit2 double mutant mice, GnRH neuron migration toward the caudal region was disturbed and GnRH axon projections to the median eminence were severely reduced. It is possible that the aberrant crossing fibers in the preoptic area led to a defect of GnRH neuron migration and a disruption of GnRH axonal pathfinding as a physical barrier.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経発生学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：GnRH ニューロン、軸索ガイダンス分子、セマフォリン 3A、ニューロピリン 1、スリット、ニワトリ胚、ニューロン移動、軸索伸長

1. 研究開始当初の背景
生殖機能を調節するゴナドトロピン放出ホルモン（GnRH または LHRH）産生ニュー

ロンは鼻ブラコードで発生し、脳内へ移動する。GnRH ニューロンの脳内への移動および定着異常は生殖機能不全を引き起こすこと

から、このニューロンの脳外から脳内への移動メカニズムの解明は重要である。標的組織近傍に存在する液性の軸索ガイダンス分子は誘引あるいは反発活性によってニューロンや神経突起を正しい標的に導き、中枢神経系の神経回路形成に関与する。ニューロンの移動や突起伸長過程には誘引と反発の異なる活性を持つ分子群の協働作用が必要である。ニワトリ胚の組織学的観察から、脳内に進入した GnRH ニューロンは神経線維依存性に中隔背側部に移動後、腹側に移動方向を変えて主要目的地である視索前野に向かうことを見出し、腹側方向への移動には誘引活性をもつネトリン分子が関与している可能性を示した (Murakami et al., 2010)。一方、*in situ hybridization* 染色の組織観察から、腹側方向への移動分岐点には、反発性軸索ガイダンス分子であるセマフォリン 3A (Sema3A) の発現があること、移動中の GnRH ニューロンは受容体ニューロピリン 1 を発現している結果を得て、Sema3A は GnRH ニューロンの移動方向の分岐点で作用する反発因子候補と想定した。GnRH ニューロンに対する反発活性を検証すれば、複数の軸索ガイダンス分子の協働作用により GnRH ニューロンの移動が制御されている可能性を提唱できると考えた。また、GnRH ニューロンの移動における反発性軸索ガイダンス分子スリットの役割については調べられていないため、発生過程にあるスリット 1,2 ダブルノックアウトマウスにおいて GnRH ニューロンの分布を調べることを計画した。

2. 研究の目的

GnRH ニューロンの脳外から脳内への移動には神経細胞接着分子や分泌性分子など様々な分子が関与することが報告されているが、これらの分子欠損で起こる移動異常の

ほとんどは脳外で生じており、脳内進入後の GnRH ニューロンの移動に関わる分子についてはネトリン分子とリーリン分子以外は調べられていない。本研究では、GnRH ニューロンの脳内移動における反発性軸索ガイダンス分子 Sema3A とスリットの役割について調べる。組織観察から想定した GnRH ニューロンの脳内移動に対する Sema3A の反発活性について、ニワトリ胚を用いたコラーゲンゲル共培養系によるケモトロピズムアッセイにて検討する。スリットについてはスリット 1,2 ダブルノックアウトマウスにおける GnRH ニューロンの分布や軸索投射の組織学的解析を行なう。

3. 研究の方法

(1) ニワトリ胚における Sema3A と受容体ニューロピリン 1 の発現パターン

GnRH ニューロンの移動が始まる孵卵 3.5 日から移動がほぼ終了する孵卵 11 日までの Sema3A とニューロピリン 1 の発現パターンの経時的变化を調べた。DIG-RNA プロブによる *in situ hybridization* 法と GnRH 抗体による免疫染色との二重染色を行い、セマフォリン 3A とニューロピリン 1 の発現が最も高い時期と部位を確認した。GnRH ニューロン上のニューロピリン 1 の発現を調べるために、蛍光 *in situ hybridization* 法と蛍光免疫染色による二重染色を行った。

(2) GnRH ニューロンの脳内移動に対する Sema3A の反発活性

移動中の GnRH ニューロンの多くは受容体ニューロピリン 1 を発現し、Sema3A 発現部位を避けて移動している可能性が考えられた。GnRH ニューロンに対するセマフォリン 3A の反発活性について、コラーゲンゲル 3 次元培養系を用いて調べた。Sema3A を導入した HEK293T 細胞塊と、孵卵 7.5 日の嗅神

経の断片あるいは中隔背側部の組織片をマトリゲル含有コラーゲンゲルに埋め、B27を加えた neurobasal の無血清培地により2日間の共培養を行った。対照群には GFP を導入した HEK293T 細胞塊を用いた。ゲル組織は4%パラフォルムアルデヒド・リン酸緩衝液(4%PFA/PB)にて固定後、GnRH 抗体を用いて免疫染色を行い、顕微鏡下で組織片から培地へと移動した GnRH ニューロン数をカウントし、解析した。さらに、受容体ニューロピリン1に対する抗体(10 μ g/ml)を培地に加え、Sema3A で誘導された GnRH ニューロンの移動抑制が受容体を介した作用かどうかについて調べた。

(3) スリット1,2 ダブルノックアウトマウスにおける GnRH ニューロンの分布

スリット1,2 ダブルノックアウトマウスは出生直後致死のため、胎生16.5日齢(E16.5)および出生直後(P0)個体で GnRH ニューロンの脳内分布および GnRH 神経線維の正中隆起への投射について免疫組織学的に調べた。同腹のスリット1^{-/-};スリット2^{+/-}マウスの GnRH ニューロン分布は野生型と変わりがなかったため、これらを対照群として用いた。胎仔脳は4%PFA/PBにて灌流固定し、16 μ m厚のクリオスタット連続切片を作成した。GnRH 抗体(マウスモノクローナル抗体 LRH13、群馬大生体調節研)による免疫染色の後、DABで発色した。GnRH ニューロンの脳内分布については、5枚おきの切片で領域ごとに GnRH ニューロン数をカウントした。

(4) スリット1,2 ダブルノックアウトマウスにおける GnRH ニューロンの移動ガイド構造と前脳神経線維の走行

脳内に入った GnRH ニューロンは中間神経フィラメントであるペリフェリン陽性線維

をガイド構造とする。また、スリット欠損により前脳内の神経路走行に異常があることが知られている。GnRH ニューロンとガイド構造となる神経線維や移動環境における他の神経路との組織学的関係について、GnRH 抗体と神経線維マーカーとの二重免疫染色によって観察した。ペリフェリンは嗅神経など末梢神経線維に発現するが、脳内神経路には発現しないため、GnRH 抗体とペリフェリン抗体あるいはニューロフィラメント抗体との二重免疫染色により異なる神経線維構造と GnRH ニューロンとの関係を調べることが可能となる。

4. 研究成果

(1) GnRH ニューロンの脳内移動における Sema3A の役割

①Sema3A とニューロピリン1の発現パターン

ニワトリ胚において、Sema3A mRNA は GnRH ニューロンの移動経路に局限した発現を示し

(図1)、移動中の GnRH ニューロンの多くが受容体ニューロピリン1 mRNA を共発現していた。GnRH ニューロン上のニューロピリン1の発現は GnRH ニューロンの移動が終了する孵卵11.5日では消失した。GnRH ニューロンは前脳吻側の Sema3A 発現領域を避けて移動している可能性が考えられる。ニューロピリン1の発現は一過性であることから Sema3A-ニューロピリン1シグナルは GnRH ニューロンの脳内移動に関与していることが示唆された。

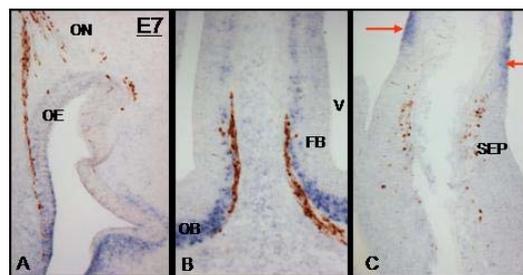


図1 ニワトリ7日胚の嗅覚-前脳系における

る Sema3A の発現パターン。前額断切片を吻側(A)から尾側(C)に並べた。Sema3A は嗅上皮(OE)、前脳吻側の嗅球原基(OB)と中隔(SEP)背側部に限局して発現している(青色)。GnRH ニューロン(茶色)は Sema3A の発現領域には分布しない(C;矢印)。

②GnRH ニューロンに対する Sema3A の反発活性

嗅神経の断片と Sema3A 強制発現細胞塊とのコラーゲンゲル共培養実験では、対照群と比べて組織片から培地に移動した GnRH ニューロンはほとんど観察されず、嗅神経束からの突起伸長も抑制された。さらに GnRH ニューロンが移動方向を腹側に転換する中隔背側部を含む組織片と Sema3A 強制発現細胞塊との共培養においても、組織片から培地に移動した GnRH ニューロンはほとんど見られず、突起伸長も抑制された。これらの共培養系において、受容体ニューロピリン 1 抗体を投与した結果、Sema3A の GnRH ニューロンに対する反発活性は有意に抑制された。脳外および脳内を移動する GnRH ニューロンはニューロピリン 1 を介して Sema3A に対し強い反発活性を有していることが判明した。嗅球原基および GnRH ニューロンの腹側方向への移動が生じる中隔背側部にそれぞれ局所的に発現するセマフォリン 3A は GnRH ニューロンの脳内移動に対し反発性に作用し、移動方向の制御に関与している可能性を示す。

GnRH ニューロンの嗅上皮から脳への移動過程にニューロピリン 2 やセマフォリン 4D が関与することはすでに報告されているが、脳内移動過程については不明であった。本研究から前脳に発現する Sema3A が GnRH ニューロンの脳内移動に関与する可能性が初めて示された。今後、時期特異的な Sema3A あるいはニューロピリン 1 の欠損もしくは

過剰発現による生体での機能検証実験が必要と考える。

(2) スリット 1,2 ダブルノックアウトマウスにおける GnRH ニューロンの分布と軸索投射

E16.5 スリット 1,2 ダブルノックアウトマウスにおける正中隆起部への GnRH 軸索投射異常は P0 個体でも確認され(図 2)、GnRH 軸索投射異常は発生の遅れによるものでないことが判明した。E16.5 スリット 1,2 ダブルノックアウトマウスの脳内 GnRH ニューロン数を調べると、対照群に比べ前方の中隔・視索前野 GnRH ニューロン数の割合が有意に多く、一方、尾側の前視床下部 GnRH ニューロン数の割合は有意に減少していた。また、発達中の嗅覚系神経線維に発現するペリフェリン陽性線維の脳内異常投射が見られた。スリット 1,2 ダブルノックアウトマウスの第三脳室前壁近傍にはニューロフィラメント陽性の異常な神経線維束の横走があり、脳内移動環境における物理的バリアが GnRH ニューロンの尾側方向への移動と、GnRH 軸索投射障害を引き起こしたものと考えられる。

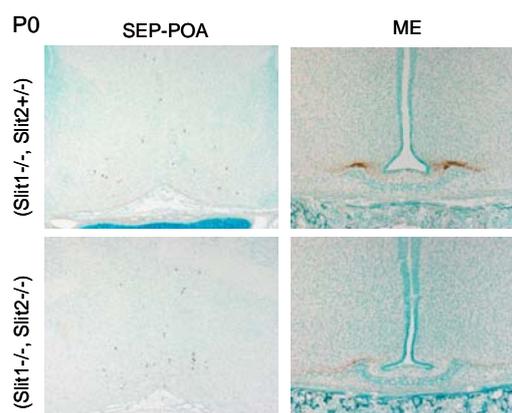


図 2 P0 における中隔-視索前野(SEP-POA)の GnRH ニューロン分布と正中隆起(ME)への GnRH 軸索投射。スリット 1,2 ダブルノックアウトマウスの SEP-POA 領域には対照群と同様の GnRH ニューロン分布が見られるが、GnRH 軸索の正中隆起(ME)への投射は著しく減少している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Kanaho Y-I, Enomoto M, Endo D, Maehiro S, Park MK, Murakami S: Neurotrophic effect of GnRH on neurite extension and neuronal migration of embryonic GnRH neurons in chick olfactory nerve bundle culture. *J Neurosci Res* 87: 2237-2244, 2009 (査読有)
- ② Murakami S, Ohki-Hamazaki H, Watanabe K, Ikenaka K, Ono K: Netrin 1 provides a chemoattractive cue for the ventral migration of GnRH neurons in the chick forebrain. *J Comp Neurol* 518: 2019-2034, 2010 (査読有)
- ③ Murakami S, Cues guiding GnRH neuronal migration in the forebrain. *J Physiol Sci* 61 Suppl1:S46 (査読なし)

[学会発表] (計5件)

- ① 村上志津子、浜崎浩子、内山安男、第114回日本解剖学会総会、GnRHニューロンと共に鼻から脳へ移動するソマトスタチン細胞、2009年3月30日、岡山理科大学(岡山)
- ② 村上志津子、浜崎浩子、内山安男、第32回日本神経科学大会、Co-migration of somatostatin mRNA-expressing cells with GnRH neurons from the olfactory placode to the forebrain. 2009年9月16日、名古屋国際会議場(名古屋)
- ③ 村上志津子、浜崎浩子、内山安男、第114回日本解剖学会総会、GnRHニューロンと共に鼻から脳へ移動するソマトスタチン細胞、2009年10月23日、第34回日本比較内分泌学会・第31回日本比較生理生化学大会合同大会、千里ライフサイエンスセンター(大阪)
- ④ 村上志津子、小野勝彦、内山安男、第115回日本解剖学会総会・全国学術集会、GnRHニューロンの移動におけるセマフォリン3Aの反発活性、2010年3月28日、岩手県民会館(盛岡)
- ⑤ 村上志津子、小野勝彦、内山安男、Semaphorin 3A provides a chemorepulsive guidance cue to migrating GnRH neurons along the olfactory nerve. *Neuro 2010* 第33回日本神経科学大会、2010年9月4日、神戸コンベンションセンター(神戸)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 志津子 (MURAKAMI SHIZUKO)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：20255649

(2) 研究分担者

小池 正人 (KOIKE MASATO)
順天堂大・医学部・准教授
研究者番号：80347210

佐々木 光穂 (SASAKI MITSUHO)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：20432536